

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN L1 DEL VIRUS DE PAPILOMA BOVINO ENTRE POBLACIONES BOVINAS COLOMBIANAS

Stephania Gongora Giron

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

Correo electrónico: stephania.gongora@correounivalle.edu.co

Andrés Castillo Giraldo

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

Correo electrónico: acastillo.doc@gmail.com

Raúl Sedano Cruz

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

Correo electrónico: raul.sedano@correounivalle.edu.co

RESUMEN

El virus del papiloma bovino es un agente epiteliotrópico infeccioso perteneciente a la familia *Papillomaviridae* que contiene un genoma circular de ADN de doble hebra. El objetivo del presente estudio fue analizar una secuencia parcial del gen L1 del virus del papiloma en bovinos colombianos. Se recolectaron 16 muestras de lesiones cutáneas obtenidas de bovinos. Amplicones de un fragmento de ADN del gen L1 de VPB se detectaron usando la técnica de la PCR mediante los cebadores MY09/MY11 en 14 muestras. Doce de ellas fueron identificadas por secuenciación directa como BPV-2, y dos como BPV-3. El análisis filogenético permitió dividir los amplicones parciales del gen L1 para el BPV-2 en dos grupos filogenéticos según su origen geográfico, y en un grupo separado las dos muestras para BPV-3. La superficie icosaédrica del virión del papilomavirus está formada por la proteína L1. En el presente estudio se evaluó el efecto del cambio de aminoácidos Leu386Val en la proteína L1 sobre la estabilidad a la cápside viral, la cual mostró una disminución de la energía libre de Gibbs en el ensamblaje de sus capsómeros.

Palabras clave: Colombia, filogenia, L1, oncología, *Papillomaviridae*, VPB-2, VPB-3.

ABSTRACT

Bovine Papilloma Virus is an epitheliotropic infectious agent belonging to the family *Papillomaviridae* that contains a circular double-stranded DNA genome. The aim of the present study was to analyse a partial sequence of the L1 gene of papilloma virus in Colombian Bovines. Sixteen samples of skin lesions obtained from bovines were collected. The amplicons of a fragment of BPV L1 DNA were detected using PCR with MY09/MY11 primers in 14 samples. Twelve of them were recognized by direct sequencing as BPV-2, and two as BPV-3. Phylogenetic analysis has allowed the amplicons of BPV-2 partial L1 gene to be divided into two phylogenetic groups per geographical origin and in one separate group the two BPV-3 samples. The icosahedral surface of the papillomavirus virion is formed by the protein L1. In the present study, we evaluated the effect of Leu386Val amino acid change in the L1

protein on the stability to the viral capsid that showed a decreasing of the Gibbs free energy in the assembly of their capsomers.

Key words: Colombia, phylogeny, L1, oncology, Papillomaviridae, VPB-2, VPB-3.

INTRODUCCIÓN

El Virus de Papiloma Bovino (VPB) es un virus sin envoltura de doble cadena circular de ADN perteneciente a la familia *Papillomaviridae* (PV), la cual se caracteriza por ser un grupo de virus oncogénicos que infectan el epitelio. El genoma de los VPB se encuentra compuesto de 8 genes de expresión temprana y dos genes de expresión tardía L1 y L2, los cuales codifican las proteínas L1 y L2 que componen la cápside viral. Esta última tiene un diámetro aproximado de 60 nm y está constituida por 72 capsómeros cada uno constituido por cinco monómeros de la proteína L1. La proteína de la cápside viral L1 ha sido también denominada como proteína mayor de la cápside viral, ya que se encuentra en mayor proporción que la proteína L2 (Vásquez *et al.* 2012). Esta proteína L1

participa en las etapas iniciales de la infección de la célula hospedera mediante interacciones con los hidratos de carbono heparán sulfato de los proteoglicanos de la superficie celular (Borzacchiello & Roperto 2008, Modis *et al.* 2002). El gen E1 codifica una proteína helicasa implicada en el proceso de replicación del genoma vírico. La proteína E2 actúa como reguladora de la transcripción viral y controla la expresión de los genes E6 o E7. El gen E3 solo está presente en VPB-2 y VPB-4, sin que se conozca aun su función en el ciclo infectivo del virus. Por el contrario, la proteína E4 está presente en todos los tipos de VPB con excepción de VPB-5 y VPB-9, esta es el producto viral más abundante en una célula infectada, pero al igual que el gen E3 no se le ha atribuido alguna función, mientras que las proteínas

E5, E6, E7 y E8 son consideradas oncoproteínas. Adicionalmente, el genoma del VPB tiene una región reguladora no codificante denominada LCR (Región Larga de Control del inglés “Long Control Region”) o URR (Upstream regulatory región), esta contiene el origen de replicación del DNA vírico y los elementos importantes del control de la transcripción (Vásquez et al. 2012).

Las infecciones por VPB en bovinos (*Bos primigenius*) han sido asociadas comúnmente con papilomatosis y fibropapilomatosis cutánea (Silvestre et al. 2009), lesiones que regularmente no inducen un deterioro en la salud del animal por sí mismas y pueden normalmente desaparecer gracias a la respuesta del sistema inmunológico (Knowles et al. 1996). Sin embargo, algunos estudios exponen que las infecciones persistentes y acompañadas de estados de inmunosupresión pueden ser un factor clave

para el desarrollo de cáncer (Borzacchiello et al. 2003, Campo et al. 1980); en Brasil, en Nasampolai Valley de Kenya, Western Highlands de Escocia y en el sur de Italia se ha encontrado ADN de VPB-4 asociado a cáncer de tracto gastrointestinal superior y en Europa, Azores Islands, algunas regiones de Kenia, Brasil, Nueva Zelanda, India y China se ha identificado ADN de VPB-1, VPB-2 y VPB-14 en casos de cáncer de vejiga urinaria (Freitas et al. 2011, Roperto et al. 2016). Entonces, complicaciones tales como el aumento en el número y tamaño de las lesiones fibropapilares, infecciones bacterianas secundarias a papilomas traumatizados y localización de verrugas en ubres y región genital pueden generar una afectación en el estado de salud del animal (Schmitt et al. 2010).

Estas infecciones epiteliales por VPB están relacionadas estrictamente con las etapas de

diferenciación de las células epiteliales del hospedero, siendo las células basales epiteliales los blancos iniciales de infección que son expuestas como resultado de micro lesiones del epitelio estratificado (Stubenrauch and Laimins 1999). Una vez estando el virión dentro de la célula basal este migra al núcleo y mantiene su genoma como plásmido extracromosomal, mientras paralelamente las células basales epiteliales se diferencian. Sin embargo, los queratinocitos no infectados salen del ciclo celular después de dejar el estrato basal y los núcleos son degradados, por el contrario las células infectadas con PV vuelven a entrar a la fase S o de síntesis del ciclo celular, en la cual se replica el ADN viral en sincronía con el ADN de la célula del hospedero, esto como consecuencia de la expresión de los genes virales tempranos E1 y E2 en cooperación con las proteínas de la replicación celular y

posterior activación de los oncogenes E5, E6 y E7 en los estratos basal y suprabasal del epitelio. Una vez replicado el ADN viral y estando como plásmido, la proteína viral E2 permite la integración del ADN viral con los cromosomas mitóticos, resultando en una distribución eficiente del ADN del PV en las células hijas. Luego, durante la morfogénesis del virión la proteína de la cápside viral L2 se liga al ADN viral favoreciendo su encapsidación. Estos viriones son ensamblados en el estrato escamoso y liberados con las escamas de queratina (Stubenrauch and Laimins 1999).

El gen L1 además de codificar una proteína de la cápside viral, la cual es clave para el proceso inicial de infección de la célula hospedera, es ampliamente utilizado como base para la taxonomía de la familia *Papillomairidae* debido a que contiene regiones altamente conservadas o similares,

permitiendo realizar comparaciones entre las secuencias de ADN de todos los papilomavirus encontrados. En 1995 durante el Taller Internacional de Virus de Papiloma en Quebec se estableció que si un nuevo PV aislado difiere en más de un 10\% respecto al ORF de L1 del tipo de PV más cercano conocido este sería establecido como un nuevo tipo de PV. Mientras que dos grupos de PV corresponden a géneros diferentes si estos comparten menos del 60\% de identidad de secuencia de nucleótidos en el ORF de L1 (de Villiers *et al.* 2004). Sin embargo, la asignación de tipos y géneros de PV no puede confiarse sólo en los porcentajes de identidad de las secuencias, pues estos no deben considerarse criterios absolutos y por lo tanto se requiere realizar una interpretación no solo de los porcentajes de identidad sino de su filogenia (Bernard *et al.* 2010). Los PV han sido aislados en más de 20 diferentes especies

de mamíferos, aves y reptiles (Doorbar 2005). Sin embargo, el PV más ampliamente estudiado ha sido el Virus de Papiloma Humano (VPH), motivo por el cual la taxonomía de la familia *Papillomaviridae* se encuentra sesgada a VPH, con más de 100 tipos de VPH, y tan solo 14 tipos de VPB, distribuidos en los géneros *Deltapapillomavirus* (VPB-1, 2, 13 y 14), *Xipapillomavirus* (VPB-3, 4, 6, 9, 10, 11 Y 12) y *Epsilonpapillomavirus* (VPB-5 y 8), con excepción de VPB-7, el cual aún no ha sido asignado a ningún género (Bocaneti *et al.* 2014, Roperto *et al.* 2016).

Características moleculares de la proteína L1

La estabilidad de la estructura molecular de las proteínas depende de la forma en que sus superficies expuestas interactúan entre sí y

con otras moléculas, por lo tanto, si hay modificación en las secuencias de sus aminoácidos podría significar una pérdida de su estabilidad termodinámica (Scitable 2014). La proteína L1 de los PV está compuesta aproximadamente de 504 aminoácidos presentando alrededor de 19 aminoácidos que son altamente conservados entre los diferentes subtipos, los cuales se sugiere cumplen con un papel fundamental en el ensamblaje de los capsomeros virales (Vanegas *et al.* 2008). Para la proteína L1 del VPB-1 se ha reportado una estructura tridimensional que comprende desde el aminoácido 14 al 482, correspondiente en su mayoría a la región central y parte del extremo carboxilo (Wolf *et al.* 2010). La región central de la proteína L1 exhibe una estructura en forma de barril compuesta por 11 láminas beta plegadas que están conectadas entre sí por lazos que establecen

puentes de hidrógeno, los cuales mantienen los monómeros de L1 juntos y confieren estabilidad a la estructura terciaria del barril (Chen *et al.* 2000). Para el extremo carboxilo se han ubicado cuatro de las cinco hélices alpha que tiene esta proteína. El extremo carboxilo presenta regiones ricas en glicinas y prolina por lo cual se propone que este segmento actúa como una bisagra que facilita los re-ordenamientos espaciales que debe hacer el extremo carboxilo para asegurar la estabilidad de la cápside viral (Chen *et al.* 2000). El extremo carboxilo, también es importante para mantener la integridad de L1; ya que cuando se introducen mutaciones en este extremo, la cápside es más susceptible a la digestión proteolítica por tripsina (Modis *et al.* 2002).

Ganado criollo colombiano

Las razas bovinas criollas conocidas en Colombia, fueron nombradas en base a la región de origen y de sus características externas más sobresalientes, así, fue denominado Costeño con cuernos (CCC) a la raza criolla de la Costa Caribe o Costa Atlántica colombiana y por la presencia de cuernos; de la misma región Caribe, el bovino Romosinuano, oriundo del valle del río Sinú y por la ausencia de cuernos, “romo” o “topo”; Hartón del Valle o Hartón caucano por el parecido de sus cuernos con un tipo de plátano denominado hartón y por la región de origen, el valle del río Cauca (Ganado criollo colombiano 2016).

El Costeño con cuernos (CCC) y el Hartón del Valle se formaron de los bovinos introducidos al continente por los conquistadores españoles. El CCC ingresó al país por dos vías: el Cabo de la Vela y Santa

Marta y por Cartagena de Indias. Esta raza se caracteriza por tolerar temperaturas altas, los adultos machos pesan entre 532 a 690 kg y las hembras entre 380 y 450 kg, la pigmentación de la piel es negra o rosada cubierta por pelo fino y corto, el cual varía entre color bayo claro y rojo cereza, la cabeza es fina y mediana, los cuernos son delgados y en forma de lira; ha sido utilizado como ganado lechero. En el año 1936, el gobierno colombiano, consciente del valor económico que los animales criollos tenían para la producción, estableció en el Valle del río Sinú, noroeste de la Costa Atlántica, el primer grupo de conservación de bovinos criollos (Ganado criollo colombiano 2016).

La población de Harton del Valle en 1999 fue la más numerosa de los criollos, alrededor de 5120, el cual ha sido criado con propósito lechero siendo la raza de más producción en este campo entre las criollas colombianas.

Presenta similitud fenotípica con el CCC donde la tonalidad del pelo varía de bayo a rojo cereza, hoscas y gris, el perfil de la cabeza es recto y subconcavo, cuernos de diámetro y longitud moderada, orientación variable. El Harton del Valle llegó al Valle del río Cauca por el sur del país, siendo derivados de los ganados de Quito por Belalcázar y sus tenientes al Patía, Pubenza y Jamundí, para luego llegar a Cali. En 1540 llegaron por Dagua a Cali algunos ejemplares provenientes de la Española y por la vía Panamá Buenaventura los provenientes de Nicaragua (Pinzón 1984). El Hartón del Valle se formó de la combinación entre razas ibéricas como La Rubio Gallega y sus modalidades Palmeña y Canarias, La Asturiana de los Valles y la Minorquina o mahonesa (Ministerio de agricultura, pesca y alimentación 1986).

A pesar de que en Colombia las lesiones fibropapilares son una afección frecuente entre los rebaños ganaderos, no se han realizado estudios de caracterización molecular de los VPB circulantes en el país. En el presente estudio se realizó la detección de los genotipos de VPB presentes en dos regiones ganaderas de Colombia mediante el análisis de secuencias del gen L1 y la identificación de los cambios presentes en las secuencias de amino-ácidos que codifica y que le conferían una mayor estabilidad termodinámica a la proteína para la conformación de la cápside viral mediante herramientas bioinformáticas.

MÉTODOS

Para la detección y caracterización del VPB se tomaron 16 biopsias de lesiones fibropapilares en *Bos primigenius* de dos regiones ganaderas colombianas, seis correspondientes a la región de La Cumbre,

Valle del Cauca(COL_VC) (3°38'59"N 76°34'6"W) y 10 correspondientes a la región de Juan de Acosta, Atlántico (COL_A) (10°49'43"N 75°02'06"W).

Para la toma de la muestra se llevó a cabo la desinfección del área de la lesión cutánea con solución de yodo (I 2%, IK 2.5% y etanol al 50%). La toma de la muestra se realizó por cirugía menor usando un bisturí quirúrgico estéril y luego se adicionó tintura de Yodo y fue realizada por un médico veterinario, bajo el aval ético # 001-016 del proyecto "Identificación y análisis filogeográfico del Virus del Papiloma Bovino de la región Caribe y Pacífica de Colombia" del Comité Institucional de Revisión ética con Animales en Experimentación Biomédica (CEAS) de la Universidad del Valle. Las biopsias fueron transportadas en PBS (1X) y almacenadas a 20 °C hasta su proceso de análisis.

Detección del VPB por PCR convencional

El ADN fue extraído de cada muestra mediante el kit de extracción DNeasy (REF. \#69506 - Qiagen, USA). Posterior a la extracción del ADN, su pureza y concentración fue cuantificada con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, USA). El ADN fue almacenado a -20 °C hasta sus análisis posteriores.

La detección del ADN del VPB fue realizada por medio de la amplificación de un fragmento del gen L1 empleando los cebadores genéricos MY11; 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3' y MY09; 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3'.

Las condiciones de la reacción de PCR se llevaron a un volumen final de 20 µL para 100 ng/ µL de ADN extraído. La desnaturalización inicial fue a 95 °C durante 5min., seguida por 40 ciclos de amplificación

consistentes en; una desnaturalización a 95 °C por 1min., un anillamiento a 55 °C por 1min., una extensión a 72 °C por 1min. Y una última extensión a 72 °C por 10min. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad). El producto de 450pb fue amplificación de ADN fue visualizado por la técnica de electroforesis con tinción de bromuro de etidio en gel de agarosa al 2% con su respectivo registro fotográfico.

Secuenciación del gen L1 del VPB

La identificación del genotipo VPB se realizó en las muestras positivas para VPB por medio del método de secuenciación "dideoxi" de Sanger de forma directa del fragmento de 450pb del gen L1 amplificado. Las secuencias obtenidas a partir de las muestras fueron curadas e identificadas mediante su comparación con secuencias de referencia

disponibles en NCBI (National Center for Biotechnology Information) para el gen L1 del VPB, revisando y corrigiendo los errores producidos al momento de la secuenciación. Las secuencias fueron alineadas mediante el algoritmo BLASTn del NCBI con secuencias de diferentes genotipos del VPB que presentaban los siguientes códigos de referencia: NC001522.1 (VPB-1); M20219.1 (VPB-2); AF486184.1 (VPB-3); X05817.1 (VPB-4); AF457465.1 (VPB-5); AB845589.1 (VPB-6); DQ217793.1 (VPB-7); DQ098917.1 (VPB-8); AB331650.1 (VPB-9); AB331651.1 (VPB-10); AB543507.1 (VPB-11); JF834524.1 (VPB-12); JQ798171.1 (VPB-13); KR868228.1 (VPB-14).

Construcción de la genealogía del VPB a partir del gen L1

La construcción se realizó utilizando los métodos de análisis disponibles en el programa de inferencia filogenética Mega6 (Tamura *et al.* 2013). Las secuencias de la región L1 utilizadas para la identificación de los VPB fueron convertidas a formato FASTA y alineadas junto a las secuencias obtenidas a partir de las muestras utilizando el algoritmo Clustal W (Higgins *et al.* 1994). A partir de los alineamientos se realizó la búsqueda del mejor modelo de sustitución de nucleótidos evolutivos mediante el programa Models (ML) (Goldman, 1993), utilizando como criterio de selección del modelo aquel que presente el menor valor del criterio de información bayesiano (BIC). Para la construcción del árbol filogenético se empleó el método de máxima verosimilitud con distribución Gamma de 5 categorías más

sitios invariables y una prueba bootstrap con un remuestreo de 1000; asumiéndose que las agrupaciones con valores de bootstrap mayores al 75% presentaban un alto nivel de confianza.

Análisis molecular de las mutaciones

Para el análisis molecular de mutaciones del fragmento de 450pb del gen L1 del VPB se realizó un alineamiento con el algoritmo clustalW disponible en el programa Mega6. A continuación, se llevó a cabo la conversión de las secuencias de nucleótidos a secuencias de aminoácidos, lo que permitió clasificarlas con respecto a sustituciones sinónimas y no sinónimas. Posteriormente, las posiciones de los cambios no sinónimos fueron identificadas utilizando las secuencias de referencia P06458, para el VPB-2; y P50805, para el VPB-3, obtenidas de la base de datos

de proteínas UNIPROT
(<http://www.uniprot.org/>).

Predicción del efecto en la estabilidad de la proteína L1 por las mutaciones no sinónimas

Para el análisis de estabilidad termodinámica de la proteína L1, se seleccionó el cambio de aminoácido no-sinónimo más frecuente identificado en el genotipo de VPB con mayor detección en las muestras analizadas, siendo este VPB-2, y se utilizó el servidor web I-Mutant (versión 2.0) (<http://folding.uib.es/i-mutant/i-mutant2.0.html>), el cual es una herramienta basada en redes neurales para el análisis de estabilidad de las proteínas y sus alteraciones tomando en cuenta las mutaciones que ocurren en un solo sitio. I-Mutant calcula el valor de cambio de energía libre (DDG) que es la diferencia entre la energía libre de la

proteína con el cambio de aminoácido menos la energía libre de la proteína con el aminoácido original. Si DDG es menor a cero la estabilidad termodinámica de la proteína disminuye, al contrario, si DDG es mayor a cero la estabilidad aumenta. Las condiciones de la predicción se realizaron a un pH neutro y una temperatura de 25°C (Abagyan y Totrov 1994, Schymkowitz *et al.* 2005). Para el análisis de predicción con I-mutant se utilizó la secuencia de referencia para VPB-2, P06458. Para la visualización del cambio del aminoácido y su efecto en la estructura 3D de la proteína L1 del VPB, como la torsión y enlaces de hidrogeno, se utilizó el cristal 3IYJ (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3IYJ>) reportado por Wolf et al., 2010, disponible en RCSB-Protein Data Bank (RCSB-PDB) y el programa visor DeepView-Swiss- PdbViewer (Guex \& Peitsh 1997).

RESULTADOS

Detección del VPB

De las 10 muestras procedentes de la región de Juan de Acosta, Atlántico, nueve fueron positivas para VPB y todas las muestras de esta región, denominadas COL_A1-9, presentaron una identidad mayor o igual al 94% con el genotipo VPB-2 por análisis Blastn (Tabla1) y agruparon filogenética con VPB-2 con un bootstrap del 96% (Figura 1). Para la construcción del árbol filogenético, el modelo de sustitución más adecuado fue Tamura 3 parámetros más distribución Gamma más sitios invariables(T92+G+I), con valor de BIC 10648,41685.

En la región de la Cumbre, Valle del Cauca, de las seis muestras, cinco fueron positivas para VPB, en donde tres presentaron una identidad del 99% con el genotipo VPB-2; y dos una identidad mayor al 97% para el VPB-3 (Tabla 1). En el árbol filogenético, las muestras COL_VC3, _VC4 y _VC5 mostraron un agrupamiento con el VPB-2 con un bootstrap del 99% y las muestras COL_VC1 y VC_2 agruparon con el VPB-3 con un bootstrap del 100% (Figura 1).



Figura 1. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima probabilidad en base al modelo Tamura 3 parámetros. Junto a las ramas se muestra los porcentajes de árboles en los que los taxones asociados se agrupan o valores de Bootstrap. Fue utilizada la distribución Gamma para modelar las diferencias de tipo evolutivas entre los sitios, más sitios invariables.

Tabla 1. Genotipificación de los VPB a partir de la secuenciación directa de un fragmento del gen L1. Donde, el código de acceso representa los identificadores de secuencia para NCBI.

Muestra	VPB	Identidad	Código de Acceso
COL_VC1	VPB-3	97%	AF486184.1
COL_VC2	VPB-3	99%	AF486184.1
COL_VC3	VPB-2	99%	JQ071446.1
COL_VC4	VPB-2	99%	JQ071446.1
COL_VC5	VPB-2	99%	JQ071446.1
COL_A1	VPB-2	99%	JQ071445.1
COL_A2	VPB-2	97%	JQ071445.1
COL_A3	VPB-2	99%	JQ071445.1
COL_A4	VPB-2	98%	JQ071445.1
COL_A5	VPB-2	99%	JQ071445.1
COL_A6	VPB-2	99%	JQ071445.1
COL_A7	VPB-2	99%	JQ071445.1
COL_A8	VPB-2	94%	JQ071445.1
COL_A9	VPB-2	99%	JQ071445.1

Análisis Molecular de las Mutaciones

Con relación a las mutaciones identificadas en las 12 muestras positivas para VPB-2 (nueve en la región del Atlántico y tres en la región del Valle del Cauca) en total se presentaron 133, en donde 90 (67,7%) fueron mutaciones sinónimas y 43 (32,3%) fueron no sinónimas, además, 64 (43,2%) fueron transiciones y 84 (56,8%) fueron transversiones. Los VPB-2 detectados en la

región del Valle del Cauca presentaron entre una a dos mutaciones no sinónimas en el fragmento de la proteína L1 analizado, y para los VPB-2 presentes en la región del Atlántico, el número de mutaciones no sinónimas vario desde un evento, para las muestras COL_A3, _A9, hasta 16 eventos en la muestra COL_A8 (Tabla 2).

El cambio de aminoácido más frecuente identificado en las 12 muestras positivas para

VPB-2 fue Leu386Val en nueve muestras, seguido por los cambios de aminoácidos en las posiciones Lys442Arg y Leu456Ile en tres muestras para cada una de las posiciones (Tabla 3).

número de mutaciones no sinónimas fue de dos para la muestra COL_VC2 y 8 para la muestra COL_VC1 (Tabla 2). Los cambios de aminoácidos más frecuentes fueron Arg345Lys y Asp354Ala en las dos muestras.

En los VPB-3 identificados en las dos muestras de la región del Valle del Cauca, el

Tabla 2. Análisis de frecuencia de mutaciones no sinónimas. Donde, No. indica el número de mutaciones no sinónimas por muestra, %: el porcentaje que representa entre mutaciones teniendo en cuenta las sinónimas, No. Transi.: el número de transiciones por muestra, No. Transv.: el número de transversiones por muestra, % Transi.: porcentaje de transiciones por muestra y % Transv.: porcentaje de transversiones por muestra.

VPB	Localidad	Muestra	No.	%	No. Transi.	No. Transv.	% Transi.	% Transv.
VPB-3	La Cumbre, Valle del Cauca	COL VC1	8	72,73	6	6	50	50
		COL VC2	2	50	3	1		
		TOTAL VPB-3	10	66,67	9	7	56,25	43,75
VPB-2	La Cumbre, Valle del Cuaca	COL VC3	1	16,67	5	1	83,33	16,67
		COL VC4	2	28,57	5	2	71,43	28,57
		COL VC5	1	16,67	5	1	83,33	16,67
	Juan de Acosta, Atlántico	COL A1	3	25,00	4	8	33,33	66,67
		COL A2	4	30,77	4	11	26,67	73,33
		COL A3	1	10,00	4	7	36,36	63,64
		COL A4	5	38,46	6	8	42,86	57,14
		COL A5	2	20,00	5	7	41,67	58,33
		COL A6	3	27,27	5	6	45,45	54,55
		COL A7	4	33,33	6	9	40,00	60,00
		COL A8	16	66,67	11	18	37,93	62,07
		COL A9	1	11,11	4	6	40,00	60,00
		TOTAL VPB-2	43	32,33	64	84	43,24	56,76
TOTAL			53	35,81	73	91	44,51	55,49

Tabla 3. Frecuencia de cambio de aminoácido no sinónimo por posición dentro de la secuencia del gen L1. Donde COL_VC representa las muestras colectadas en la Cumbre Valle del Cauca; COL_A las muestras colectadas en Juan de Acosta, Atlántico; TOTAL A el número de cambios no sinónimos por posición dentro de la secuencia de L1; TOTAL B el número de cambios de aminoácido no sinónimo por muestra.

Muestra	Thr329Cys	Asp332Tyr	Asn333Asp	Gly336Val	Gly336Ile	Asn338His	Leu339Phe	Ser342Arg	Asn348Ser	Ala349Glu	Ala349Thr	Glu366Asp	Lys369Arg	Leu370Arg	Ser378Cys	Leu386Val	Leu386Gly	Ser387Gly	His388Cys	Leu389Val	Met393Gln	Asn399Asp	Glu401Gln	Ser409Pro	Ser410Pro	Ile419Leu	Gly440Ala	Lys442Arg	Leu456Ile	Pro460Ala	TOTAL B
COL_VC	3																										X			1	
	4														X												X			2	
	5																										X			1	
COL_A	1									X						X													X		3
	2	X	X													X													X		4
	3															X															1
	4			X	X		X		X							X															5
	5				X											X															2
	6				X											X													X		3
	7						X	X			X					X															4
	8											X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	1
	9															X															6
TOTAL A	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	1		1

Predicción del cambio Leu386Val en la estabilidad termodinámica de la proteína L1

El resultado del análisis de estabilidad de la proteína L1 con el programa I-Mutant para el cambio Leu386Val mostro un DDG igual a

0,35, lo que significa un aumento en la estabilidad de la proteína. Posteriormente, se visualizó la estructura cristalina de la proteína L1 con el visor DeepView-Swiss-PdbViewer y se observar que el aminoácido Leu386 se encuentra expuesto en la superficie de cada monómero de la proteína L1, además de estar

haciendo parte de una hélice alpha (Figura 2). Con el programa mutate del DeepView-Swiss-PdbViewer se realizó el cambio del aminoácido Leu386Val lo que generó una

disminución de las fuerzas electroestáticas de 4.1 a -4.1 Kcal/mol, sin embargo, no se presenta ni pérdida ni formación de nuevos enlaces de hidrógeno.

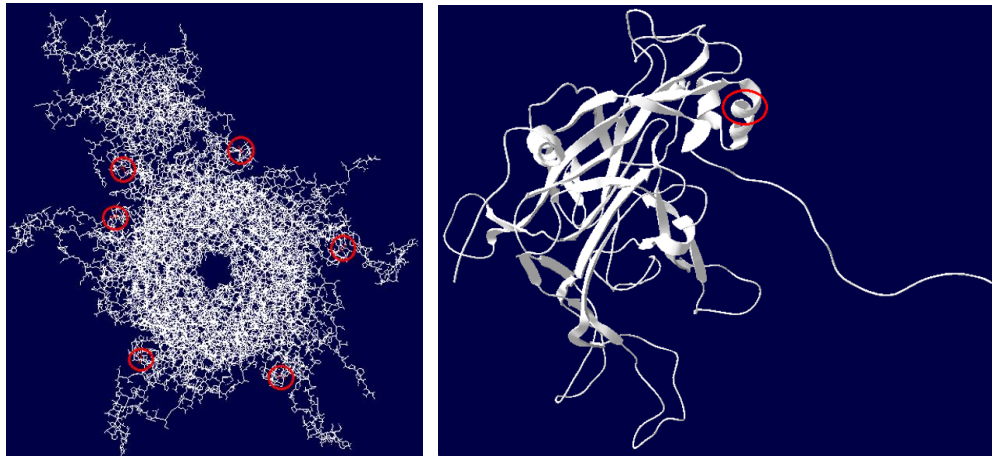


Figura 2. Estructura cristalina 3IYJ de la proteína L1. A la izquierda se puede observar la estructura cuaternaria de la proteína L1 y a la derecha la estructura secundaria. Los círculos señalan la ubicación del aminoácido 386 dentro de la estructura cuaternaria y secundario de L1.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron en total 16 muestras, las cuales 10 fueron recolectadas de Juan de Acosta, Atlántico y seis de la Cumbre, Valle del Cauca. El resultado obtenido a partir del análisis de la PCR mostró que, de las 10 muestras del Atlántico, una muestra no amplificó para PV y el resto

fueron positivas para el VPB-2 según el alineamiento pareado realizado con el algoritmo BLASTn. En contraste, las muestras del Valle del Cauca mostraron que tres muestras fueron positivas para el VPB-2, dos muestras fueron positivas para el VPB-3 y una no amplificó. Cabe remarcar el hecho que a pesar que se analizaron más muestras

procedentes de Juan de Acosta, Atlántico, no se identificó VPB-3 por secuenciación (Figura 1).

En Sur América, se han reportado diversos estudios realizados en Brasil, siendo el único país de la región en donde se han descrito todos los tipos de VPB conocidos hasta ahora. En Brasil, se ha identificado el VPB-2 en *Bos primigenius* y en epitelio de equinos, siendo esto último asociado a sarcoides equinos (Vázquez *et al.* 2012, Otten *et al.* 1993, Alcântara *et al.* 2015). Igualmente, VPB-2 ha sido detectado en útero, líquido amniótico y placenta, siendo descrito como agente causal o inductor de abortos o anomalías en el feto; en células de esperma congelado comercial, lo cual ha generado preocupaciones en Brasil por el uso generalizado de semen congelado en la industria de inseminación artificial; y en papilomas y fibropapilomas cutáneos y a

tumores de vejiga urinaria (Vázquez *et al.* 2012, Roperto *et al.* 2008). Por otra parte, el VPB-3 solo ha sido identificado en papilomas cutáneos y en piel sana de Bovinos en Brasil (Vázquez *et al.* 2012).

El presente estudio reporta la detección de ADN de VPB-2 y VPB-3 en lesiones fibropapilares en *Bos primigenius* en las razas criollas colombianas, lo que permite ampliar la información de rango de distribución de VPB a nivel regional.

A nivel mundial, ha sido detectado el VPB-2 en Alemania, India, Japón, Italia, Portugal, Rumania, Nueva Zelanda y España en *Bos primigenius* y en USA, Canadá, Reino Unido, Polonia, Suiza y Australia, en equinos siendo asociado a sarcoides equinos (Vázquez *et al.* 2012). Con relación, al VPB-3 se ha identificado en papilomas cutáneos y en piel sana en Japón (Vázquez *et al.* 2012). Las infecciones por VPB han sido descritas a lo

largo de todo el mundo, siendo VPB-1 y VPB-2 los más frecuentes a nivel mundial y los de más amplia distribución (Vázquez *et al.* 2012), lo cual explica el hecho de que en 14 muestras positivas para ADN de PV, 12 fueron positivas para VPB-2 (Tabla 1).

Para el virus del papiloma humano (VPH) ha sido identificado variantes moleculares para casi todos los genotipos, y estos en su mayoría se agrupan en árboles filogenéticos cuyas ramas o grupos se separan de acuerdo con las áreas geográficas de su procedencia (Calleja-Macias *et al.* 2005, Ho *et al.* 1993). Por ejemplo, las variantes de VPH-16 se agrupan en las ramas filogenéticas: Europea, Africana 1 y 2, Asiático-Americana y Norteamericana (Yamada *et al.* 1997). Adicionalmente la variante norteamericana se presenta exclusivamente en las tribus de indígenas norteamericanos (Yamada *et al.* 1995). Estudios filogenéticos sugieren que

los PV son de origen monofilético y coevolucionaron con las especies hospederas, sin embargo, la diversificación de las variantes de cada tipo viral esta enlazada con la evolución y la migración de la especie hospedera. Estas variantes en el gen L1 podrían alterar la respuesta inmunológica del hospedero a los epítopes específicos de las variantes, además podría influir en el ensamblaje de la partícula viral (Cruz *et al.* 2013).

En el presente estudio se puede observar para VPB-2 agrupamientos filogenéticos de acuerdo con las áreas geográficas de procedencia: La Cumbre, Valle del Cauca (COL_VC) y Juan de Acosta, Atlántico (COL_A) (figura 1), lo que podría estar relacionado con las diferentes rutas de entrada del ganado criollo a Colombia, ya que los bovinos CCC ingresaron por el norte de Colombia: Cabo de la Vela, Santa Marta y

Cartagena de Indias; y los bovinos Harton del Valle por el sur de Colombia: Quito y Buenaventura (Ganado criollo colombiano 2016).

Con relación, a los cambios de aminoácidos en la proteína L1 identificados en los VPB y si estas pueden tener un efecto en la patogenicidad y reconocimiento antigénico por parte del sistema inmune del hospedero, según la literatura, se han realizado estudios en el VPH que demuestran que los cambios presentes en las variantes no parecen afectar el reconocimiento por los anticuerpos neutralizantes, debido a que la respuesta inmune protectora es polivalente, es decir, está dirigida a varios epítopes presentes en diferentes regiones de la proteína L1 (Vanegas *et al.* 2008). Sin embargo, la respuesta inmune contra cada uno de los genotipos si podría ser específica.

En experimentos en murinos se ha demostrado que los cambios presentes en las variantes pueden dar lugar a epítopes que no son reconocidos por los anticuerpos monoclonales neutralizantes, lo cual podría afectar el ensamblaje de los capsómeros interfiriendo negativamente con su inmunogenicidad (Roden *et al.* 1997 & Yang *et al.* 2005). Para explicar cómo los monómeros de la proteína L1 se mantienen unidos formando un capsómero, Modis *et al.* (2002) han propuesto un modelo del brazo invasor que sugiere que cada capsómero dona y recibe al mismo tiempo cinco brazos terminales de los pentámeros vecinos; de manera similar a como se observado en otros virus como el SV40 y el poliomavirus murino. La orientación del brazo del extremo carboxilo, en el cual se ubican cuatro de las cinco hélices alfa de L1, hacia cada subunidad L1 vecina tiene como finalidad

formar puentes disulfuro, entre el residuo de cisteína en la posición 175 y la cisteína de la posición 428 ubicado en el brazo C-terminal del monómero adyacente, y así, generar una mayor estabilidad a la cápside viral. Por lo cual, cambios entre los aminoácidos 175 y 428, como el Leu386Val, identificado en el presente estudio, podrían generar cambios en la estabilidad de L1 afectando la energía electrostática del capsomero viral.

En conclusión, en el presente estudio se reporta la presencia de los virus bovinos VPB-2 y VPB-3 en dos regiones ganaderas de Colombia. Los cuales presentaron como característica molecular importante un cambio aminóacidico en la proteína L1 Leu386Val y que podría generar una mayor estabilidad termodinámica para la conformación de la capsida viral.

Además, es importante realizar más estudios moleculares para identificar los tipos de VPB presentes en otras zonas ganaderas de Colombia para conocer los genotipos que están circulando en el país y así, poder implementar estrategias más eficaces para la erradicación de patologías asociadas a la infección por papilomavirus bovinos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco enormemente a la Universidad del Valle por permitir adquirir todo el conocimiento previo para la realización del presente estudio. Al doctor Andrés Castillo Giraldo por ser la persona quién me guio durante todo el proceso y siempre estuvo con muy buena disposición al igual que el doctor Raúl Sedano Cruz, quien participó del estudio como codirector y aportó todo su conocimiento para la realización del presente. A la doctora Cecilia Aguilar de Plata por su apoyo y colaboración con los equipos del laboratorio. A la doctora Alejandra Arbeláez Vásquez por el suministro de reactivos. A Eliecer Jimenez Charris por su gran colaboración en la obtención de las muestras. Al veterinario Ricardo Malaver Acero por su colaboración en la implementación del protocolo de muestreo.

LITERATURA CITADA

Abagyan R. and Totroy. M. (1994), “Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins”, *J. Mol. Biol.*, Vol. 235 No.3, pp. 983-1002.

Alcântara B., Alfieri, A., Headley, S., Rodrigues, W., Otonel, R., Lunardi, M. and Alfieri, A. (2015), “Molecular characterization of bovine Deltapapillomavirus (BPVA, 2 and 13) DNA in equine sarcoids”, *Pesq. Vet. Bras.*, Vol. 35 No. 4, pp 431-436.

Bernard H., Burk, R., Chen, Z., Doorslaer, K., Hausen, H. and Villier, F. (2010), “Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments”, *Virology*, Vol. 401, pp. 70-79.

Bocaneti F., Altamura, G., Corteggio, A., Velescu, E., Roperto, F. and Borzacchiello, G. (2014), “Bovine Papillomavirus: New Insights into ans Old Diseases”, *Transboundary and Emerging Diseases*, doi: 10.1111/tbed.12222

Borzacchiello G., Iovane, G., Marcante, M., Poggiali, F., Roperto, F., Roperto, S. and Venuti, A. (2003), “Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows”, *Journal of General Virology*, Vol. 84, pp. 2921-2926.

Borzacchiello G. and Roperto, F. (2008), “Bovine papillomaviruses, papillomas and cáncer in cattle”, *Vet. Res.*, Vol. 39 No.45, doi: 10.1051/vetres:2008022.

Campo M.S., Moar, M.H., Jarrett, W.F.H. and Laird, H.M. (1980), “A new papillomavirus associated with alimentary cancer in cattle”, *Nature*, Vol. 286, pp. 180-182.

Calleja-Macias I., Villa L., Prado J., Kalantari M., Allan B. and Williamson A. (2005), “Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, and 58, four close relatives of human papillomavirus type 16”, *J. Virology*, Vol. 79, pp. 13630-40.

Chen, X.S., Garcea, R.L., Goldberg, I., Casini, G. and Harrinson, S.C. (2000), “Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16”, *Mol. Cell.*, Vol. 5, pp. 557-567.

Cruz, J.F., Márquez, L., Quintero, M., Bastidas, M. and Puig, J. (2013), “Estudio de variantes intra-tipo del virus del papiloma humano tipo 16, por análisis nucleotídico de la región MY09-MY11”, *Rev. Obstet. Ginecol. Venez.*, Vol. 73 No.3, pp. 187-194.

Doorbar, J. (2005), “The papillomavirus life cycle”, *Journal of Clinical Virology*, Vol. 32, pp 7-15.

Freitas, A.C., Silva, M.A.R., Jesus, A.L.S., Mariz, F.C., Cordeiro, M.N., Albuquerque, B.M.F. and Batista, M.V.A. (2011), “Recent insights into Bovine Papillomavirus”, *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5 No. 33, pp. 6004-6012. doi: 10.5897/AJMRX11.020.

Ganado criollo colombiano (2016), “Breve reseña histórica”, disponible en: www.ganadocriollo-colombiano.com/razas-2/harton-del-valle-harton (fecha de acceso 07 Diciembre 2016).

Goldman, N. (1993), “Statistical tests of models of DNA substitution”, *Journal of Molecular Evolution*, Vol. 36, pp. 182-198.

Guex N. and Peitsch, M.C. (1997), “SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling”, *Electrophoresis*, Vol. 18 No. 15, pp. 2714-2723.

Higgins D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994), “CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice”, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 22, pp. 4673-4680.

Ho, L., Chan, S.Y., Burk, R.D., Das, B.C., Fujinaga, K. and Icenogle, J.P. (1993), “The Genetic Drift of Human Papillomavirus Type 16 Is a Means of Reconstructing Prehistoric Viral Spread and the Movement of Ancient Human Populations”, *J. Virol.*, Vol. 67, pp. 6413-6423.

I-Mutant (2016), “Predictor of protein stability changes upon single point mutations”, available at: <http://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html> (accessed 12 december 2016).

Knowles G., O Neil, B.W. and Campo, M.S. (1996), “Phenotypic characterization of lymphocytes infiltrating regressing papilomas”, *J. Virol.*, Vol. 70, pp. 8451-8458.

Ministerio de agricultura, pescas y alimentación (1986), Catalogo de razas autóctonas españolas, Bovinos, Dirección General de la Producción Agraria, España.

Modis Y., Trus, B. and Harrinson, S. (2002), “Atomic model of the papillomavirus capsid”, *The EMBO Journal*, Vol. 21 No. 18, pp. 4754-4762.

National Center for Biotechnology Information (1988), “Basic Local Aligment Search Tool”, available at: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (accessed 12 december 2016).

Otten, N., von Tscherner, C., Lazary, S., Antczak, D.F. and Gerber, H. (1993), “DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing”, *Archives of virology*, Vol. 132 Vol. 1-2, pp. 121-31.

Pinzon, E. (1984), “Historia de la Ganadería Colombiana”, Supl. Ganadero, Banco Ganadero, Vol.4 No.1, Bogotá.

Protein Data Bank (2016), “3IYJ Bovine Papillomavirus type 1 outer capsid”, available at: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3IYJ> (accessed 12 december 2016).

Quiagen (2006), DNeasy Blood & Tissue Handbook, USA.

Roden, R., Armstrong, A., Haderer, P., Chistensen, N., Hubbert, N. L. and Lowy, D. (1997), “Characterization of a Human Papillomavirus Type 16 Variant-Dependent Neutralizing Epitope”, \textit{J. Virol.}, Vol. 78, pp. 6247-6252.

Roperto S., Roperto, B., Francesca, P., Chiara, U., Russo, V., Borzacchiello, G., Pagnini, U., Raso, C., Roperto, F. and Venuti, A. (2008), “Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: posible biological role”, \textit{J. Gen. Virol.}, Vol. 89, pp. 3027-3033.

Roperto, S., Munday, J., Corrado, F., Gorla, M. and Roperto, F. (2016), “Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle”, \textit{Veterinary Microbiology}, Vol. 190, pp. 1-4.

Schmitt M., Fiedler, V. and Müller, M. (2010), “Prevalence of VP8 genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BOV genotyping assay”, \textit{Journal of Virology Methods}, Vol. 170, pp. 67-72.

Schymkowitz J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F. and Serrano, L. (2005), “The FoldX web server: an online force field”, \textit{Nucleic Acids Res.}, 33 (Web Server issue): W382-8.

Scitable (2014), “Protein Structure”, available at: \url{https://translate.google.com/translate?hl=en&sl=auto&tl=es&u=http%3A%2F%2Fwww.nature.com%2Fscitable%2Ftopicpage%2Fprotein-structure-14122136&anno=2&sandbox=1} (accessed 14 November 2016).

Silvestre O., Borzacchiello, G., Nava, D., Iovane, G., Russo, V., Vecchio, D., D Ausilio, F., Gault, E., Campo, M.S. and Paciello, O. (2009), “Bovine Papillomavirus Type 1 DNA and E5 Oncoprotein Expression in Water Buffalo Fibropapillomas”, \textit{Veterinary Pathology}, Vol. 46 No. 4, pp. 636-641.

Stubenrauch, F. and Laimins, L. (1999), “Human papillomavirus life cycle: active and latent phases”, \textit{Seminars in Cancer Biology}, Vol. 9 No. 6, pp. 379-386.

Tamura K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. and Kumar, S. (2013), “MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0”, \textit{Molecular Biology and Evolution}, Vol. 30, pp. 2725-2729.

UniProt (2016), “UniProtKB VL1_BPV”, available at: \url{http://www.uniprot.org/uniprot/?query=VL1_BPV \&sort=score} (accessed 12 december 2016).

Vanegas, V.A., Rubio, A.I., Bedoya, A.M., and Sanchez, G.I. (2008), “Estructura molecular y antigénica de la vacuna contra el Virus del Papiloma Humano 16 (VPH 16)”, \textit{Acta biol. Colomb.}, Vol. 13 No. 3, pp. 37- 48.

Vázquez R., Escudero, C., Doménech, A., Gómez-Lucía, E. and Benítez, L. (2012), “Papilomatosis bovina: Epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV)”, \textit{Revista Complutense de Ciencias Veterinarias}, Vol. 6 No. 2, pp. 38-57.

de Villiers E., Fauquet, C., Broker, T., Bernard, H. and Zur Hausen, H. (2004), “Classification of papillomaviruses”, \textit{Virology}, Vol. 324 Vol. 1, pp. 17-27.

Wolf, M., Garcea, R.L., Grigorieff, N and Harrison, S.C. (2010), “Subunit interactions in bovine papillomavirus”, \textit{Proc.Natl.Acad.Sci}., Vol. 107, pp. 6298-6303.

Yamada, T., Wheeler, C.M., Halpern, A.L., Stewart, A.C.M., Hildesheim, A. and Jenison, S.A. (1995), “Human Papillomavirus Type 16 Variant Lineages in Unites States Populations Characterized by Nucleotide Sequence Analysis of the E6, L2, and L1 Coding Segments”, \textit{J. Virol}., Vol. 69, pp. 7743-7753.

Yang, R., Wheeler, C.M., Chen, X., Uematsu, S., Takeda, K. and Akira, S. (2005), “Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cáncer”, \textit{J. Virol}., Vol. 79, pp. 6741-6750.